

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
7. Februar 2002 (07.02.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/09788 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61L 27/22, 27/54 (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/02893

(22) Internationales Anmeldedatum:
1. August 2001 (01.08.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 37 850.1 1. August 2000 (01.08.2000) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: JENNISSEN, Herbert, P. [DE/DE]; Von-der-Vogelweide-Strasse 39, 45279 Essen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): CHATZINIKO-LAIDOU, Maria [DE/DE]; Keplerstrasse 95, 45147 Essen (DE). RUMPF, Heike [DE/DE]; Westfalenstrasse 1, 45770 Marl (DE).

(74) Anwalt: NOBBE, Matthias; Viering, Jentschura & Partner, Centroallee 263, 46047 Oberhausen (DE).

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



A1

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING BIOACTIVE IMPLANT SURFACES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG BIOAKTIVER IMPLANTATOBERFLÄCHEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing bioactive implant surfaces consisting of metallic or ceramic materials, to be used for implants such as artificial joints or very small implants such as so-called stents. The invention also relates to implants produced according to this method.

WO 02/09788

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung bioaktiver Implantatoberflächen von metallischen oder keramischen Materialien, die für Implantate wie künstliche Gelenke oder auch Kleinstimplantate, z.B. sogenannte Stents, verwendet werden, als auch nach dem Verfahren hergestellte Implantate.

Verfahren zur Herstellung bioaktiver Implantatoberflächen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung bioaktiver Implantatoberflächen von metallischen oder keramischen Materialien, die für Implantate wie künstliche Gelenke, Zahnimplantate oder auch Kleinstimplantate, z.B. sogenannte Stents, verwendet werden, als auch nach dem Verfahren hergestellte Implantate, die als sogenannte „aktive device“ eine kontrollierte Freisetzung der bioaktiven Moleküle von den Implantatmaterialen erlauben.

Die Implantation künstlicher Gelenke oder Knochen hat in den letzten Jahren eine zunehmende Bedeutung z.B. bei der Behandlung von Gelenkdysplasien oder -luxationen bzw. bei Erkrankungen, die auf der Abnutzung von Gelenken als Folge von Gelenkfehlstellungen entstehen können, gewonnen. Die Funktion der Implantate und die für ihre Herstellung verwendeten Materialien, die neben Metallen wie Titan oder Metalllegierungen auch Keramik oder Kunststoffmaterialien wie Teflon umfassen können, sind stetig verbessert worden, so dass Implantate nach erfolgreichem Heilungsverlauf in 90-95% der Fälle Standzeiten von 10 Jahren aufweisen können. Ungeachtet dieser Fortschritte und besserter operativer Verfahren bleibt eine Implantation immer noch ein schwieriger und belastender Eingriff, insbesondere da sie mit einem langwierigen Einheilungsprozeß des Implantates, der oft monatelange Klinik- und Kuraufenthalte einschließlich Rehabilitationsmaßnahmen umfaßt, verbunden ist. Neben den Schmerzen stellen dabei für die betroffenen Patienten die Länge der Behandlungsdauer und die Trennung von der vertrauten Umgebung große Belastungen dar. Ferner verursacht der langwierige Heilungsprozeß durch die erforderliche intensive Betreuung hohe Personal- und Pflegekosten.

Das Verständnis der Vorgänge auf der molekularen Ebene, die für ein erfolgreiche Einwachsen eines Implantates erforderlich

sind, hat sich in den letzten Jahren bedeutend erweitert. Entscheidend für die Gewebeverträglichkeit eines Implantates sind Strukturkompatibilität und Oberflächenkompatibilität. Die Biokompatibilität im engeren Sinne ist alleine von der 5 Oberfläche bedingt. Auf allen Ebenen der Integration spielen Proteine eine maßgebliche Rolle. Wie nachfolgend erläutert, entscheiden sie bereits während der Implantationsoperation durch die Ausbildung einer initialen adsorbierten Proteinschicht über den weiteren Verlauf der 10 Implantateinheilung, da sich auf dieser Schicht später die ersten Zellen ansiedeln.

Bei der molekularen Interaktion zwischen Implantat, das auch als Biomaterial bezeichnet wird, und Gewebe, findet eine 15 Vielzahl von Reaktionen statt, die streng hierarchisch geordnet zu sein scheinen. Als erste biologische Reaktion findet die Adsorption von Proteinen an der Oberfläche des Biomaterials statt. In der dadurch entstandenen Proteinschicht werden anschließend einzelne Proteinmoleküle beispielsweise entweder 20 durch Konformationsänderungen zu Signalstoffen umgewandelt, die auf der Oberfläche präsentiert werden, oder durch katalytische (proteolytische) Reaktionen werden als Signalstoffe wirkende Proteinfragmente freigesetzt. Ausgelöst durch die Signalstoffe, findet in der nächsten Phase die zelluläre Besiedlung statt, 25 die eine Vielzahl von Zellen wie Leukozyten, Makrophagen, Immunozyten, und schließlich auch Gewebezellen (Fibroblasten, Fibrozysten, Osteoblasten, Osteozyten) umfassen kann. In dieser Phase spielen andere Signalstoffe, sogenannte Mediatoren, wie z.B. Cytokine, Chemokine, Morphogene, Gewebshormone und echte 30 Hormone eine entscheidende Rolle. Im Falle einer Biokompatibilität kommt es schließlich zur Integration des Implantates in den Gesamtorganismus, und idealerweise erhält man ein Permanentimplantat.

35 Im Licht von Arbeiten, die in den letzten Jahren auf

- molekularer Ebene der Osteogenese durchgeführt worden sind, haben chemische Signalstoffe, die sogenannten "bone morphogenic Proteins" (BMP-1-BMP-14), die Einfluß auf das Knochenwachstum besitzen, eine zunehmende Bedeutung gewonnen. BMPs
- 5 (insbesondere BMP-2 und BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7) sind osteoinduktive Proteine, die Knochenneubildung und Knochenheilung stimulieren, indem sie die Proliferation und Differenzierung von Vorläuferzellen zu Osteoblasten bewirken. Darüber hinaus fördern sie die Bildung von alkalischer
- 10 Phosphatase, Hormonrezeptoren, knochenspezifischer Substanzen wie Kollagen Typ 1, Osteocalcin, Osteopontin und schließlich die Mineralisation. Die BMP-Moleküle regulieren dabei die drei Schlüsselreaktionen Chemotaxis, Mitose und Differenzierung der jeweiligen Vorläuferzelle. Darüber hinaus spielen BMPs eine
- 15 wichtige Rolle in der Embryogenese, Organogenese des Knochens und anderer Gewebe, wobei als Zielzellen Osteoblasten, Chondroblasten, Myoblasten und vaskulare glatte Muskelzellen (Proliferationshemmung durch BMP-2) bekannt ist.
- 20 Inzwischen sind 14 BMPs inklusive multipler Isoformen bekannt. Bis auf das BMP-1 gehören die BMPs der "transforming growth factor beta" (TGF- β) Superfamilie an, für die spezifische Rezeptoren auf den Oberflächen der entsprechenden Zellen nachgewiesen wurden. Wie der erfolgreiche Einsatz von
- 25 rekombinannten humanen BMP-2 und/oder BMP-7 in Versuchen zu Defektheilungsprozessen an Ratten, Hunden, Kaninchen und Affen gezeigt hat, scheint keine Speziespezifität vorzuliegen. Bisherige Versuche, die knochenbildungsauslösenden Eigenschaften der BMPs gezielt für Implantationszwecke
- 30 auszunutzen, indem das BMP-2 und/oder BMP-7 nicht-kovalent auf metallische oder keramische Biomaterialien aufgebracht wurden, sind jedoch weitestgehend erfolglos verlaufen.
- Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin,
- 35 verbesserte Biomaterialien zur Verwendung als Implantate

bereitzustellen, die sich durch eine erhöhte Beladungsdichte mit Mediatormolekülen, insbesondere BMPs, und eine verlängerte Langzeitabgabe in das die Implantate umgebende Gewebe auszeichnen.

5

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe dadurch gelöst, dass ein Verfahren zur Herstellung bioaktiver Implantatoberflächen von metallischen oder keramischen Materialien bereitgestellt wird, bei dem in einem ersten Schritt Ankermoleküle mit hydrophoben Resten an der Oberfläche des Implantatmaterials kovalent gebunden werden und in einem zweiten Schritt Mediatormoleküle auf das so behandelte Implantatmaterial gegeben werden, die infolge nicht-kovalenter Wechselwirkungen zwischen den Mediatormolekülen und den hydrophoben Resten der Ankermoleküle immobilisiert werden, wobei im ersten Schritt die Beladungsdichte der Ankermoleküle auf der Implantatoberfläche in Abhängigkeit von der Kettenlänge des hydrophoben Restes des Ankermoleküls so gewählt wird, daß die Ankermoleküle selbst miteinander nicht in Wechselwirkung treten und in Abhängigkeit von der überdeckten Fläche auf dem Implantatmaterial, die von einem einzelnen im zweiten Schritt absorbierten Mediatormolekül bedeckt wird, mindestens 10, bevorzugt 15 Kontaktstellen zwischen den hydrophoben Resten der Ankermoleküle zur hydrophoben Wechselwirkung mit dem Mediatormolekül gebildet werden.

Unter der nicht gewünschten Wechselwirkung zwischen den Ankermolekülen ist in erster Linie eine sterische Wechselwirkung zu verstehen, die hier nicht gewünscht ist, damit die Ankermoleküle sterisch voneinander ungehindert mit den Mediatormolekülen in Wechselwirkung treten können.

Unter Kontaktstelle ist erfindungsgemäß der Ort der größten hydrophoben Wechselwirkung zwischen einem Rest der Ankermoleküle und dem Mediatormolekül zu verstehen. Dabei

können an einem Rest durch Verzweigung des Restes mehrere Kontaktstellen vorhanden sein. So kann eine endständig mit einer Methylgruppe substituierte Kohlenstoffkette zumindest zwei Kontaktstellen besitzen. Die Erfinder haben erkannt, daß

5 es bei der Immobilisierung der Mediatormoleküle durch hydrophobe Wechselwirkung entscheidend auf die Anzahl der Kontaktstellen zur hydrophoben Wechselwirkung zwischen den Resten und dem Mediatormolekül ankommt. Dabei sind möglichst nah benachbarte Kontaktstellen von Vorteil, so daß stärker

10 verzweigte Reste bevorzugt sind, da hierbei mehrere benachbarte Kontaktstellen zur Verfügung stehen. Beispielsweise ist eine endständige Trimethylgruppe an einem hydrophoben Rest gegenüber einer geradkettigen unverzweigten Kette mit gleicher Gesamtzahl an Kohlenstoffatomen bevorzugt.

15

Bei dem erfindungsgemäßen Immobilisierungsverfahren wird insbesondere ein Substitutionsgrad des Ankermoleküls, damit indirekt (d.h. Oberflächenkonzentration des immobilisierten Proteins), erreicht, der eine multivalente Wechselwirkung

20 zwischen Oberfläche und Zelle erlaubt und ermöglicht, die Knochen- oder Gewebsbildung wirksam zu steuern.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren werden bevorzugt in einem ersten Schritt Alkyl-, Alkenyl- oder Alkinyl- oder Arylreste

25 mit 1 bis 30, bevorzugt 3 bis 20, besonders bevorzugt 3 bis 8 Kohlenstoffatome, die auch durch Silizium in der Alkylkette und/oder Heteroatome wie N, O oder S in der Alkylkette und/oder im Arylring ersetzt sein können, bevorzugt in einer verzweigten Kette, die auch gegebenenfalls mit einem oder mehreren

30 Substituenten von Halogen, Alkoxy-, Hydroxyl-, Thiol-, Amino-, Alkyl- oder Dialkylamino-Gruppen, wobei die Alkylgruppen des Substituenten bevorzugt 1 - 6 Kohlenstoffatome aufweisen und geradkettig oder verzweigt sein können, substituiert sein können, vorzugsweise aber unsubstituiert und besonders

35 bevorzugt verzeigt sind, an die Oberfläche des

Implantatmaterials kovalent gebunden. Diese Bindung der Reste kann jeweils über eine Kopplung über eine Silylgruppe, eine Bromcyan-Gruppe oder eine Aminogruppe, beispielsweise eines Aminoalkans, erfolgen.

5

In einem zweiten Schritt können Mediatormoleküle wie Knochenwachstumsfaktoren mittels nicht-kovalenter Bindung, vermutlich aufgrund hydrophober Wechselwirkungen auf dem Implantatmaterial immobilisiert werden. Dadurch wird ermöglicht, eine chemotaktisch wirkende und/oder biologisch aktive, eine sogenannte juxtakrine, Implantatoberfläche auszubilden, die zur Ansiedlung, Proliferation und Ausdifferenzierung von Knochenzellen führt. So lassen sich sogenannte aktive Implantate bereitstellen, die bei von der Oberfläche freigesetzten Molekülen auch auf eine Entfernung von 500 bis 1000 nm eine chemotaktische Wirkung auf Zellen, im Falle von BMPs auf Osteoblasten, zeigen.

Die Bestimmung der Beladungsdichte der Implantatoberfläche mit Ankermolekülen, die in der Regel nur einen hydrophoben Rest mit, je nach Verzweigungsgrad, mindestens einer Kontaktstelle besitzen, erfolgt in der Regel ausgehend von der Größenabschätzung des gewöhnlich als Ellipsoid vorliegenden Mediatormoleküls. Danach wird nach Kenntnis der auf die Implantatoberfläche projizierten Fläche des Mediatormoleküls die Anzahl der erforderlichen Kontaktstellen mit mindestens 10 bestimmt und in Abhängigkeit davon die Kettenlänge und der Verzweigungsgrad der Ankermoleküle festgelegt. Daraus errechnet sich dann die Beladungsdichte.

30

Anfängliche Untersuchungen der Erfinder ergaben, daß nach Modifikation von Titanoberflächen mit Aminopropylsilan (APS) die Anzahl der immobilisierten Aminogruppen mit dem Bolton-Hunter Reagens bestimmt Werte im Bereich von 1.0-2.5 nmol/cm² ergaben. Unter Berücksichtigung der Loschmidt'schen Zahl

ergeben sich bei 1 nmol/cm² ca. 60 Moleküle/10 nm². Aus diesem Wert kann man einen mittleren Abstand der APS-Moleküle von einander von ca. 0.4-0.5 nm errechnen, was als vernünftiger Wert erscheint.

5

Im Falle der Kopplung des Proteins Ubiquitin ($m = 8.5$ kDa) erhielten die Erfinder Maximalwerte von 1-2 µg/cm². Bei Rechnung mit 1 µg/cm² erhält man 3.85×10^{-11} Mole/cm². Die Umrechnung auf Moleküle ergibt dann 2.3 Moleküle Ubiquitin pro 10 nm², somit einen mittleren Abstand der Moleküle unter der Annahme einer punktförmigen Größe von 6-7 nm, was bei einer geschätzten tatsächlichen Größe von 3-4 nm Durchmesser für das Ubiquitin-Molekül eine recht hohe Packungsdichte in Form vermutlich einer Monoschicht auf der Oberfläche bedeutet. Da 15 man bei der Adsorption von Ubiquitin ähnlich hohe Werte (wie bei der Kopplung von BMP-2) im Bereich von 1-3 µg/cm² (= 2-6 Mole Ubiquitin/10 nm²) erhält, konnten die Erfinder berechnen, daß im Schnitt einem Molekül Ubiquitin 10-30 APS Moleküle APS (60/6 und 60/2) für eine Wechselwirkungsreaktion zur Verfügung 20 stehen. Somit konnten die Erfinder abschätzen, daß ein Molekül Ubiquitin eine Fläche bedeckt (sog. "Footprint"), das in etwa diese Anzahl von APS-Molekülen enthält, d.h. es können maximal 10-30 APS-Moleküle theoretisch mit einem Molekül Ubiquitin reagieren, wobei von einer statistischen Reaktion auszugehen 25 ist.

Unter der Annahme einer hydrophoben Adsorption werden nach Feststellung der Erfinder nicht alle (d.h. 30) Propylreste mit dem Ubiquitin reagieren können, da es nicht so viele 30 "hydrophobic patches" für eine geometrisch definierte Bindung auf einer Seite des Moleküls besitzt. Nach Schätzung der Erfinder werden daher maximal 4-10 Alkylreste am Ubiquitin eine spezifische Bindungsstelle finden können und tatsächlich zur Adsorption von Ubiquitin führen.

Reduziert man nun den Substitutionsgrad d.h. die Anzahl der Alkylreste/10 nm², wird der Abstand so groß, daß nicht mehr genügend Reste mit dem Ubiquitin reagieren können, und es findet keine Adsorption mehr statt. Anderseits, wenn man die 5 Alkylkettenlänge erhöht, wird die Bindungsenergie einer Alkylkette mit dem Protein erhöht, und man benötigt nur noch weniger Alkylreste, um ein Molekül Ubiquitin zu binden.

Bei Verwendung von BMP-2 ($m = 26$ kDa) mit einer Größe von ca. 4 10 x 4 x 8 nm besitzen (Bindung auf Längsseite) haben die Erfinder zunächst eine maximale Belegung von etwa 0.5 – 1 Molekül pro 10nm² angenommen. Das bedeutet, daß das BMP-2 auf Grund eines etwa doppelt so großen "footprints" nur etwa die halbe Anzahl der Moleküle absorbiert werden, dafür auch etwa doppelt so 15 viele immobilisierte Alkylreste (20-50) bedecken kann, von denen auch wiederum nach Berechnung der Erfinder vermutlich nur maximal 8-20 für Wechselwirkungen mit dem BMP-2 sterisch zur Verfügung stehen.

20 Von Versuchen der Erfinder mit Hexylagarosanen, die nur etwa 7-8 Alkylreste/10 nm² besitzen, ist diesen bekannt, daß eine Adsorption von BMP-2 bei dieser geringen Anzahl von Wechselwirkungspartnern nicht möglich ist. Daher haben Versuche der Erfinder ergeben, daß nur in einem höheren Bereich von ca. 25 10-60 Alkylresten/10 nm² bei einem berechneten Abstand der Reste von 0.5-3 nm eine zufriedenstellende Adsorption von BMP-2 möglich ist. Eine Adsorption mit einer Halbwertszeit der Freisetzung von 90-100 Tagen ist nach Erkenntnis der Erfinder nur möglich, wenn eine Anzahl von mindestens 8-15 Alkylreste 30 pro BMP-2-Molekül zur Reaktion an spezifischen Stellen zur Verfügung stehen kann. Diese Wechselwirkung wird allerdings nach Berechnung der Erfinder bei einem Substitutionsgrad von unter 10 Alkylresten/10 nm² statistisch wohl nur schlecht sein, so daß höhere Substitutionsgrade erfolgversprechender sind.

Seitens der Erfinder wurde festgestellt, daß eine Abhängigkeit der Kettenlänge der eingesetzten Alkylreste und des Abstandes der Alkylreste voneinander zur bestmöglichen Absorption von Mediatormolekülen besteht. Auf der einen Seite darf die Länge
5 der Ketten nicht so groß sein, daß die Reste auf der Implantatoberfläche zusammengeknäult sind, auf der anderen Seite muß der Abstand der Reste zueinander so groß sein, daß diese nicht miteinander in Wechselwirkung treten. Je nach Größe des absorbierten Mediatormoleküles ergeben sich somit für den
10 Einzelfall bestmögliche Werte für die Belegung der Oberfläche des Implantates hinsichtlich der Kettenlänge, des Verzweigungsgrades der Kette als auch des Abstandes der Reste. Für die Absorption des BMP-2 haben die Erfinder eine Belegung von 10 bis 60 Resten pro 10 nm², bevorzugt 10 bis 30 Resten pro
15 10 nm² bei einer Kettenlänge zwischen 1 bis 30, bevorzugt 1 bis 20, besonders bevorzugt 1 bis 8 Kohlenstoffatomen, bevorzugt in einer Kette, die auch gegebenenfalls mit einem oder mehreren Substituenten von Halogen-, Alkoxy-, Hydroxyl-, Thiol-, Amino-,
Alkyl- oder Dialkylamino-Gruppen substituiert sein können,
20 festgestellt.

In einer bevorzugten Variante wird zur Erhöhung der Wechselwirkung zwischen den Resten auf der Oberfläche des Implantates und den Mediatormolekülen zunächst die Oberfläche
25 des Implantates durch Aufbringen einer hydrophilen Beschichtung hydrophilisiert, in einem weiteren Schritt werden dann die hydrophoben Reste auf der so modifizierten Oberfläche immobilisiert und dann die Mediatormoleküle zur nicht-kovalenten hydrophoben Wechselwirkung mit den Resten auf die
30 Oberfläche gegeben, wobei für BMP-2 bevorzugt die oben angegebenen Verhältnisse von Kettenlänge und Belegungsgrad verwendet werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Immobilisierung der
35 Mediatormoleküle zeichnet sich dadurch aus, dass das

eingesetzte Implantatmaterial aus metallischen Materialien wie Reintitan oder metallischen Titanlegierungen wie Chrom/Nickel/Aluminium/Vanadium/Kobalt-Legierungen (z.B. TiAlV4, TiAlFe2,5), Edelstähle (z.B. V2A, V4A, Chrom-Nickel 5 316L) oder keramischen Materialien wie Hydroxylapatit, Aluminiumoxid oder aus einer Kombination, bei der z.B. metallisches mit keramischem Material beschichtet ist, besteht. Es sind auch Kunststoffpolymermaterialien zur Verwendung als Implantatmaterial geeignet.

10

Es ist auch Gegenstand der Erfindung, durch Beschichtung einer koronaren Gefäßstütze (sogenannter Koronarer Stent, Länge ca. 10 mm) mit Hilfe eines Biomoleküls oder eines Mediators, z.B. BMP-2, die Spätkomplikation Restenose, die durch eine 15 Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen hervorgerufen wird, therapeutisch zu verhindern oder zu mildern, um damit die Einheilung und Verträglichkeit zu fördern.

Erfindungsgemäß können die Mediatormoleküle Biomoleküle sein, 20 die vorteilhaft für die Biokompatibilität des Implantates sind, indem sie einer möglichen Abstoßung des Implantates entgegenwirken und/oder das Einwachsen des Implantates fördern.

Als Mediatormoleküle können im vorliegenden Verfahren bevorzugt 25 das Knochenwachstum fördernde Proteine aus der Klasse der Knochenwachstumsfaktoren 'Bone Morphogenic Proteins' oder auch Ubiquitin verwendet werden. Vorteilhaft kann zur Immobilisierung ein Protein dieser Klasse allein, in Kombination mit weiteren Mitgliedern dieser Klasse oder auch 30 zusammen mit Biomolekülen wie Proteinen anderer Klassen oder niedermolekularen Hormonen oder auch Antibiotika zur Verbesserung der Immunabwehr eingesetzt werden. Dabei können diese Moleküle auch über im biologischen Milieu spaltbare Bindungen auf der Oberfläche Immobilisiert werden.

Erfindungsgemäß wird die Oberfläche des Implantatmaterials bevorzugt chemisch aktiviert, wobei die Aktivierung über ein Silanderivat wie beispielsweise γ -Aminopropyltriethoxysilan oder ein Trimethylmethoxy- bzw. Trimethylchlorsilanderivat oder

5 3-Glycidoxypolytrimethoxysilan erfolgt und die Reaktion sowohl in einem wässrigen als auch in einem organischen Lösungsmittel durchgeführt wird. An die so aktivierte Oberfläche kann in einem zweiten Schritt Mediatormoleküle mittels nicht-kovalenter Bindung auf dem Implantatmaterial

10 immobilisiert werden.

Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man für die hydrophobe Interaktion als stationäre unlösliche Phase einen Träger verwendet, auf der an daran befindlichen gitterförmig angeordneten apolaren Gruppen eine monomolekulare, entropisch geordnete Wasserstruktur entsteht. Eine gleichartige geordnete monomolekulare Wasserschicht ist auf den hydrophoben Arealen des Proteins (BMP) vorhanden. Treten die beiden Moleküle (z.B. Alkylreste und BMP-2) mit ihren monomolekularen Wasserschichten miteinander in Kontakt, werden die Wasserschichten zerstört, indem aus der geordneten Wasserstruktur ein ungeordneteres System aus einzelnen Wassermolekülen wird. Die freie Energie der Wechselwirkung entsteht somit durch eine Zunahme der Entropie der Wassermoleküle. Bei höherer Temperatur werden 25 diese hydrophoben Wechselwirkungen stärker (größere freie Energie).

Das BMP muß zur hydrophoben Interaktion mit einem geeigneten hydrophoben Träger gebracht werden. Ein solcher Träger besteht 30 beispielsweise aus einer unlöslichen Phase und daran befindlichen hydrophilen und hydrophoben chemischen Strukturen. Insbesondere eignen sich als Träger alle festen Phasen mit hydrophilen Oberflächen, die zusätzliche hydrophobe/apolare Gruppen tragen.

Spezielle Beispiele für solche Träger organischer und anorganischer Art sind Zellulosen, Agarosen oder entsprechende mit Kohlenhydraten oder Polyhydroxykohlenstoffketten d. h. hydrophil beschichtete Polymerpartikel sowie, Silika-, Zeolith- oder Aluminiumhydroxidpartikel.

Neuartige Träger sind hydrophile Metallocberflächen, die beispielsweise in einem späteren Verfahren entsprechend mit Alkyl- oder Arylgruppen gitterförmig belegt/substituiert werden. Auf solchen festen Phasen liegen geeignete Substitutionsgrade mit hydrophoben Gruppen in einem Bereich von 0.01 bis 3.0 nmol/cm², bevorzugt in einem Bereich von 0,01 bis 2,0 nmol/cm², wobei die oben angegebenen Verhältnisse insbesondere bei Verwendung von BMP-2 eingehalten werden sollen.

Als hydrophile feste Phase eignen sich zur Substitution mit hydrophoben Gruppen vorzüglich in verdünnter Säure gereinigte Metallocberflächen oder mit Chromschwefelsäure veredelte Metallocberflächen mit Kontaktwinkeln zwischen 0-90°, vorzugsweise 0-20°. Insbesondere eignen sich als hydrophob interagierende mit verdünnter Säure gereinigte Metallocberflächen wie Titan, Stahl, Stahllegierungen wie Cr-Mo-Stahl oder mit Chromschwefelsäure veredelte Stahl- oder Titanoberflächen, die mit Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Butyl-, Pentyl-, Hexyl-, Octyl-, Decyl-, Dodecyl-, oder Hexadecylgruppen substituiert wurde (Kettenlänge 1-30, bevorzugt 1-20, besonders bevorzugt 1 bis 8 Kohlenstoffatome, bevorzugt in einer Kette, die auch durch ein oder mehrere Substituenten wie Methyl-, Ethyl-, Methoxy-, Ethoxy-Gruppen oder Halogenatome wie Chlor, Fluor substituiert sein kann). Die hydrophobe Alkylwechselwirkung kann verstärkt werden durch Kombination mit einem Schwefelatom beispielsweise in Form einer Thioetherbindung oder als Thiol wie (Mercaptopropylreste).

Besondere Formen hydrophober Wechselwirkung können auch mit immobilisierten aromatischen Resten (Phenyl- oder Tolyreste, 6-7 C-Atome) insbesondere in Kombination mit Schwefelatomen (Phenylthiosilan, oder Thienylreste, 4-6 C-Atome) erzielt werden.

Die hydrophobe Interaktion an den Kontaktstellen erfolgt bei Temperaturen von 0° -100° C vorzugsweise bei 5-50° C bei einem pH-Wert von 3.0-11.0, vorzugsweise bei pH 6-10. Vorzugsweise geeignete Substitutionsgrade mit den Resten liegen bei 0.1-2,5 nmol/cm², was einem Gitterabstand der auf der Oberfläche kovalent gekoppelten Alkyl- oder Arylgruppen von 0.2-5 nm entspricht, bevorzugt 0.3-1 nm.

Bei einem Molekül von 5-6 nm Durchmesser, beispielsweise des BMP-2, könnte bei hohen Substitutionsgraden und somit kleinen Gitterabständen (0,2-1 nm) mehrere solcher Reste mit dem Molekül reagieren und es fest binden. Die Bindungsstärke (Affinität) der Oberfläche ist somit der Kettenlänge des Alkylrestes und dem Substitutionsgrad proportional und nimmt mit diesen Parametern stark zu. Eine vorzugsweise Bindung des BMP-2 erfolgt ab einer Kettenlänge von C-1, bevorzugt C-3 (Propyl) bei einem Substitutionsgrad von 0.01-2,5 nmol/cm², bevorzugt von 0.2-1 nmol/cm². Bei kürzeren Alkylketten sind höhere und bei längeren Ketten niedrigere Substitutionsgrade als Mindestgrößen bevorzugt.

Für die Synthese von alkyl- oder arylbeladenen Metallocberflächen eignen sich Alkyltrichlorsilane (Methyltrichlorosilan, Ethyltrichlorosilan, Propyltrichlorosilan, etc.), Dialkyldichlorsilane (Dimethyldichlorosilan, Diethyldichlorsilan, Dipropyldichlorsilan etc.), Trialkylchlorosilane (Trimethylchlorosilan, Ethyldimethylchlorosilan, Propyl. etc.), Alkyltrimethoxysilane Methyltrimethoxysilan, Ethyl-, Propyl-

etc.), Alkyltriethoxysilane (Methyltriethoxysilan, Ethyl-, Propyl- etc.), Phenyltrichlorosilan, Phenyldimethylchlorosilan, Phenylthiotrimethylsilan, p-Tolyltrichlorosilan.

- 5 Weitergehende Untersuchungen der Erfinder haben gezeigt, dass die Verankerung der Alkyl- oder Arylreste auf der Oberfläche des Implantatmaterials qualitativ und quantitativ verbessert werden kann, indem man auf der Implantatoberfläche eine hydrophile Beschichtung, 10 beispielsweise Agarose, Polyacrylat, oder vorzugsweise durch Erhöhung der Anzahl der auf der Oberfläche verfügbaren Metalloxid-Einheiten vorsieht.

Seitens der Erfinder wurde gefunden, dass die Anzahl der 15 Oxidgruppen überraschenderweise dadurch erhöht werden kann, dass die Oberfläche des Metalls mit heißer, vorzugsweise bodensatzfreier, Chromschwefelsäure behandelt wird. Im Gegensatz zu der Erwartung, dass sich das Metall unter diesen Bedingungen auflöst, wird bei Verwendung dieser 20 Säure eine neuartige im wesentlichen gleichmäßige 5-50 nm dicke hydrophile Oxidschicht auf der Oberfläche des Metalls erzeugt. Das Verfahren ist so schonend, daß selbst koronare Gefäßstützen, sogenannte Stents (die z.B. aus Edelstahl oder Titan gefertigt sein können) ohne Zerstörung des 25 dünnen empfindlichen Gitterwerkes (50-150 µm Durchmesser) beschichtet werden können. Bei Großimplantaten kann die hydrophile Oxidschicht unter definierten Bedingungen eine Dicke von 10 µm bis zu 100 µm erreichen und relativ "glatt" ohne Vertiefungen oder Löcher aufgebaut werden. Als Metall 30 für das Implantat kann dabei Reintitan oder Titanlegierungen (z.B. TiAlV4, TiAlFe2,5), Aluminium oder rostfreier Stahl (z.B. V2A, V4A, Chrom-Nickel 316L, Cr-Mo-Stahl) eingesetzt werden. Eine handelsübliche 35 Chromschwefelsäure mit 92 Gew.-% H₂SO₄, 1,3 Gew.-% CrO₃ und einer Dichte von 1,8 g/cm³ beispielweise von der Firma

Merck erhältlich, wird bevorzugt zur Erzielung einer dünnen glatten Schicht aus Metalloxid verwendet. Dazu wird das Metallsubstrat in die Chromschwefelsäure eingelegt und über einen Zeitraum von 1 bis zu 3 Stunden bei 100 bis 250°C behandelt, vorzugsweise 30 bis 60 Minuten bei 240°C danach sorgfältig mit Wasser abgespült, danach in Wasser oder einer Lösung von 1-4 % EDTA (Ethylendiamintetraacetat) pH 7,0, vorzugsweise 2% EDTA pH 7,0 30 min gekocht, um auf der Oberfläche verbliebene Schwermetallionen, z.B. Chromionen zu entfernen, und dann getrocknet.

Wenn eine dickere Metalloxidschicht an der Metallocerfläche und/oder bevorzugt eine Oxidschicht mit kleinen Mikro- und Nanoporen versehen werden soll, wird die oben beschriebene Chromschwefelsäure mit Wasser auf eine Dichte von 1,5 bis 1,6 g/cm³ verdünnt. Bei einer dann folgenden wie oben beschriebenen Behandlung des Metallimplantatoberfläche mit der so verdünnten Säure wird eine "raue" Oberflächenschicht mit Vertiefungen und Poren ausgebildet, so dass die zur Beladung mit Mediatormolekülen zur Verfügung stehende Oberfläche vergrößert wird. Durch Einstellung unterschiedlicher Dichten an Chromschwefelsäure und unterschiedliche Behandlungszeiten und -temperaturen ist es daher möglich, eine Vielzahl verschiedener Oxidschichten unterschiedlicher Eigenschaften auf Metallocerflächen mit hoher Haftfestigkeit aufzubringen. Die Erfindung ist daher auch auf ein solches Verfahren zur Ausbildung einer thermodynamisch einheitlichen Metalloxidschicht (keine Kontaktwinkelhysterese) auf dem Implantatmaterial mittels heißer Chromschwefelsäure gerichtet.

Die Metalloxidschicht auf dem Implantatmaterial aus den oben genannten Materialien kann dann über Behandlung mit verdünnter Salpetersäure (ca. 5 Gew.-%) und anschließende

Kopplung eines Silanderivates, aktiviert werden.

Über die Moleküle des Silanderivates können dann die
Mediatormoleküle auf der Implantatoberfläche nicht-kovalent
5 verankert werden.

Als Implantatmaterial kann auch ein keramisches Material
wie beispielsweise Hydroxylapatit verwendet werden. Das
Hydroxylapatit sollte dabei zunächst durch Behandlung mit
10 Aminoalkylsilan aktiviert werden und die Ankermoleküle dann
verankert werden. Erfindungsgemäß sind unter Ankermoleküle
solche Moleküle zu verstehen, die auf der Oberfläche des
Implantates verankert werden und mit den Mediatormolekülen
nicht-kovalent Wechselwirkungen zeigen, wenn im nächsten
15 Schritt eine nicht-kovalente Bindung der Mediatormoleküle
wie BMP an die Oberfläche erfolgt.

Falls unter den Kopplungsbedingungen die eingesetzten
Mediatoren im Medium schwerlöslich sind, kann die
20 Löslichkeit durch Zugabe von Tensiden/Detergentien erhöht
und die Reaktion durchgeführt werden. So können bei pH-
Werten > 6 schwerlösliche Knochenwachstumsfaktoren und
andere Mediatoren durch ionische oder nichtionische
Detergentien im Konzentrationsbereich 0.05-10%,
25 vorzugsweise 1 - 5 Gew.%, insbesondere bei 0.066% SDS bei
pH-Werten > 6, insbesondere bei pH 8-10 für nicht-kovalente
Bindungsverfahren im alkalischen pH-Bereich ohne Verlust
der biologischen Aktivität in Lösung gehalten werden.

30 Der Einfluß der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren
modifizierten Materialien auf Knochenzellen wurde im
Tierversuch untersucht, wobei die modifizierten Materialien
zu diesem Zweck in Plättchen- oder Hantelform hergestellt
wurden. Dabei wurde beobachtet, dass es 4 Wochen nach dem
35 Einbringen in die Tiere zu einer beschleunigten

Knochenbildung mit Kontakt zur Implantatoberfläche durch BMP-2 auf den Materialien kam.

- Anhand der folgenden Beispiele wird die vorliegende
5 Erfindung weiter veranschaulicht.

Modifikation von Metallen (Titan, 316 L rostfreier Stahl):

- Es können entweder mechanisch polierte/elektropolierte,
anodisch oxidierte Titanplättchen oder mit poröser
10 Titanlegierung plasmagespritzte Titanlegierungsplättchen
mit oder ohne Chromschwefelsäureveredelung eingesetzt
werden. Gleichermaßen können rostfreie mechanisch
polierte/elektropolierte Stähle mit oder ohne
Chromschwefelsäureveredelung eingesetzt werden.

15

Reinigungsverfahren

- Vor jedem Einsatz werden die Metalle gereinigt durch
Erhitzen auf 80 °C in 5% HNO₃ für 2 Stunden. Nach erneutem
Waschen in Wasser wurden die Plättchen durch Waschen in 30
20 ml trockenem Methanol getrocknet. Danach wurden sie
entweder direkt weiter verwendet oder mit
Chromschwefelsäure veredelt.

Chromschwefelsäureveredelung

- 25 Bei der Chromschwefelsäureveredelung wurden die
Titanplättchen bei 190-240 °C für 30-90 min und die
Stahlplättchen bei 190-230 °C für 30-90 min in
Chromschwefelsäure (92% H₂SO₄, 1.35 CrO₃) inkubiert. Danach
wurden die Metallproben mit Wasser ausgiebig gewaschen und
30 dann in 2% EDTA pH 7.0 und anschließend in Wasser für
jeweils 30 Minuten gekocht. Nach erneutem Waschen in Wasser
wurden die Plättchen durch Waschen in 30 ml trockenem
Methanol getrocknet.

- 35 Beladung von Oberflächen mit Aminopropyltriethoxysilan:

Die gereinigten Träger (5-10 Titanplättchen) wurden mit oder ohne Chromschwefelsäureveredelung in einem Teflonhalter mit 47.5 ml Toluol und 2.5 ml Aminopropylthriethoxysilan unter Inertgas versetzt und verschlossen. Sodann wurde der Ansatz unter Rückfluß und unter langsamem Rühren 3-3.5 Stunden gekocht. Die Plättchen wurden dann 3 mal mit 10 ml Trichlormethan, Aceton und Methanol gewaschen und dann luftgetrocknet. Bei der angegebenen Aminopropyltriethoxysilankonzentration konnten mit Hilfe der Bolton-Hunter-Methode eine Oberflächenkonzentration an Aminogruppen von 1.5 bis 2.5 nmol/cm² bestimmt werden.

Beladung von Oberflächen mit Trialkylmonochlorsilanen:

Die gereinigten Träger (Metallplättchen) wurden mit oder ohne Chromschwefelsäureveredelung mit einer 5%igen Trialkylsilanlösung (v/V) in trockenem Toluol versetzt, die zusätzlich 5% Pyridin (v/v) enthält. Nach einer Reaktionsdauer von 1-3 Std. wird mit Ethanol, 0.01M Salzsäure und dest. Wasser gewaschen. Bei Bedarf können die Träger bei 60 - 110 °C im Vakuum getrocknet werden.

Beladung von Oberflächen mit Alkyltrimethoxysilanen:

Die gereinigten Träger (Metallplättchen) wurden mit oder ohne Chromschwefelsäureveredelung mit einer 5%-igen Lösung Alkyltrimethoxysilanlösung (v/V) in trockenem Trichloroethylen versetzt. Nach einer Reaktionsdauer von 12 Std. bei Raumtemperatur wird mit Trichlorethylen, Aceton und Ethanol gewaschen. Im Falle von Mercaptopropyltrimethoxysilan muß UV-Licht ausgeschlossen werden. Bei Bedarf können die Träger (ohne SH-Gruppen) bei 100-110° im Vakuum getrocknet werden.

Beladung von Oberflächen mit Dichlordialkyl- und Trichloralkylsilanen:

Die gereinigten Träger (Metallplättchen) wurden mit oder
5 ohne Chromschwefelsäureveredelung wurden mit einer 5-
10%igen Dichlordialkyl- oder Trichloralkylsilanolösung (v/V)
in trockenem Toluol versetzt. Nach einer Reaktionsdauer von
1-3 Std. wird mit Ethanol und dest. Wasser gewaschen. Bei
Bedarf können die Träger bei 60-110 °C im Vakuum getrocknet
10 werden.

Bindung von rhBMP-2 an ein Propylamin-Titanbindungsgitter:

Die Propylamin-beschichteten Titanplättchen wurden mit 125
mM NaBorat Puffer, 0.066% Natriumdodecylsulfat, pH 10.0
15 gewaschen und äquilibriert. Sie wurden dann mit einer
rhBMP-2 Lösung (rekombinantes humanes BMP-2) (0.2-0.3 mg/ml
in 125 mM NaBorat Puffer, 0.066% Natriumdodecylsulfat, pH
10.0) versetzt und 12-14 Stunden bei Raumtemperatur unter
Schütteln inkubiert. Danach wurden sie 4 x mit Boratpuffer
20 gewaschen und anschließend mit Wasser.

Bindung rhBMP-2 an elektropoliertes Titan: 10-30ng/cm²

Bindung rhBMP-2 an chromschwefelsäureveredeltes Titan: 2-
10ng/cm²

Bindung rhBMP-2 an chromschwefelsäureveredeltes Propylamin-
25 Titanbindungsgitter: 100-270ng/cm²

Ähnlich hohe Werte lassen sich bei einem reinen Propyl-
Titanbindungsgitter auch für chromschwefelsäureveredeltes
Titann erzielen. Dabei ist zu beobachten, dass das hydrophob
30 adsorbierte BMP-2 sich allerdings nicht durch ausgedehntes
Waschen mit Pufferlösungen oder Wasser abwaschen lässt.

Wie oben angegeben, konnte erstaunlicherweise die nicht-
kovalent gebundene Beladung mit BMP-2 auch nicht durch
35 Verwendung eines Tensids wie mit einer 1% SDS-Lösung entfernt

werden, was auf äußerst starke Adsorptionskräfte schließen läßt. Diese hydrophoben Wechselwirkungen können durch Charge-Transfer-Komplexe, H-Brückenbildung und Ladungsschwächung verstärkt werden, während eine Substitution der Kette mit 5 Hydroxyl- oder Thiol-Gruppen sowie eine Ladungsverstärkung durch z.B. Ammoniumreste zur Schwächung der hydrophoben Wechselwirkungen führt.

Dabei stellten die Erfinder bei ihren Versuchen fest, daß eine 10 kontrollierte Abgabe von BMP-2 durch eine an dem Alkylrest vorhandene positive Ladung entscheidend beeinflußt werden kann. Dabei spielt der pK-Wert der alkalischen Gruppe -NH₂ eine wichtige Rolle, der bei pK 8-12 liegen kann und durch eine 15 Substitution des Stickstoffes, beispielsweise zum quaternären Ammoniumion, stark beeinflußt werden kann, so daß eine vom pH abhängige ladungsbeeinflußte Adsorption und spätere Freisetzung des BMP-2 an der Oberfläche erfolgen.

Auch bei einem pH-Wert von 7,0, im physiologischen Bereich, ist 20 die nicht kovalente Bindung zwischen den auf dem Metall immobilisierten hydrophoben Liganden und dem BMP-2 außerordentlich stabil, so daß pro Tag maximal 0,1-1% des adsorbierten BMP's freigesetzt wird. Da im Fall von mit Aminogruppen substituierten Gruppen auf der Implantatoberfläche 25 sowohl die Aminogruppen als auch das BMP bei einem pH-Wert von 7,0 positiv geladen sind, ist dabei eine elektrostatische Adsorption praktisch ausgeschlossen.

Die oben beschriebenen Versuche wurden unter entsprechend 30 angepassten Bedingungen mit den übrigen in der beigefügten Tabelle Verbindungen durchgeführt. Dabei handelt sich um Mittelwerte von jeweils 4 Experimenten mit Standardabweichung. Die Plättchen (5 x 10 x 1 mm ; = 1 cm²) wurden nach Vorreinigung mit HNO₃ oder nach Vorbehandlung 35 mit Chromschwefelsäure einzeln 4x in 125 mM Borat, 0.066%

SDS, pH 10, 15 min gewaschen. Die Adsorptionsbedingungen waren wie folgt: ^{125}I -BMP-2-Lösung: $C_{\text{bmp}} = 0.1\text{mg/ml}$ in 125 mM Borat, 0.066% SDS, pH 10; 12-14 Std. bei 5°C.

- 5 Die in der Tabelle verwendeten Abkürzungen haben die folgende Bedeutung:

Ti-EP	: elektropoliertes Metall
Ti-CSB	: mit Chromschwefelsäure behandeltes Metall
θ_v	: Vorrückwinkel (Randwinkelmessung nach Wilhelmy)
10 θ_R	: Rückzugswinkel (Randwinkelmessung nach Wilhelmy)
$t_{1/2}$: Halbwertszeit der Freisetzung von ^{125}I -rhBMP-2

Tabelle - Nicht-kovalente Immobilisierung von rhBMP-2 auf alkyl- fluoroalkyl-, phenyl- und fluorophenylmodifizierten Titanoberflächen

	Silanisierungsagens	Titan (elektropliert) ng/cm ²	Chromschwefelsäure- behandelt ng/cm ²	Titan	Ti-EP	Ti-CSB	Ti-EP
				$\theta_V, {}^\circ$	$\theta_R, {}^\circ$	$\theta_V, {}^\circ$	$\theta_R, {}^\circ$
							$T_{1/2}$ (Tage)
1	Ti-Kontrolle 1 (unspezifische Adsorption)	29 ± 4		2 ± 2	40 34 33 48	17 12 16 8	0 3 0 0
2	$\begin{array}{c} OC_2H_5 \\ \\ H_2NCH_2CH_2CH_2Si - OCH_2H_5 \\ \\ OC_2H_5 \\ C_9H_{23}NO_3Si \\ \text{Aminopropyltriethoxysilan (APS)} \end{array}$	21 ± 2		105 ± 14	87 86 18 87	19 87 31	29 31 67
3	$\begin{array}{c} CH_3 \\ \\ Cl - Si - Cl \\ \\ CH_3 \\ C_2H_6C_{12}Si \\ \text{Dimethylidichlorosilan (DDS)} \end{array}$	69 ± 29		228 ± 16	77 87	58 52	47 48
4	$\begin{array}{c} Cl \\ \\ CH_3CH_2CH_2 - Si - Cl \\ \\ Cl \\ C_3H_7C_{13}Si \\ n\text{-Propyltrichlorosilan (PTC)} \end{array}$		71 ± 5	121 ± 25	87 87	53 56	60 61

	Silanisierungsagens	Titan (elektropoliert) ng/cm ²	Chromschwefelsäure- behandelt ng/cm ²	Titan θ _V , °	Ti-EP θ _R , °	Ti-CSB θ _V , °	Ti-EP θ _R , °	T _{1/2} (Tage)
5	$\begin{array}{c} \text{OCH}_3 \\ \\ \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2 - \text{Si} - \text{OCH}_3 \\ \\ \text{OCH}_3 \end{array}$ $\text{C}_6\text{H}_{16}\text{O}_3\text{Si}$ Propyltrimethoxysilan (PTM)	68 ± 10	121 ± 27	81 85	22 18	88 86	23 25	
6	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2 - \text{Si} - \text{Cl} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ $\text{C}_5\text{H}_{13}\text{ClSi}$ Propyldimethylchlorosilan (PDMC)	43 ± 2	68 ± 10	87 84	33 7	39 38	1 2	
7	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2 - \text{Si} - \text{Cl} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ $\text{C}_6\text{H}_{16}\text{ClSi}$ n-Butyldimethylchlorosilan (BDMC)	31 ± 2	64 ± 3	72 70	12 4	74 75	4 5	

	Silanisierungsgagens	Titan (elektropoliert) ng/cm ²	Chromschwefelsäure- behandelt ng/cm ²	Ti-EP $\theta_V, {}^\circ$ $\theta_R, {}^\circ$	Ti-CSB $\theta_V, {}^\circ$ $\theta_R, {}^\circ$	Ti-EP $T_{1/2}$ (Tage)
8	$\begin{array}{c} \text{Cl} \\ \\ \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{Si}-\text{Cl} \\ \\ \text{Cl} \end{array}$ <p>$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{Cl}_3\text{Si}$ Hexytrichlorosilan (HTC)</p>		218 ± 16 81 ± 8	87 87	7 13	63 54
K	<u>Ti-Kontrolle 2</u> (unspezifische Adsorption)		15 ± 3	5 ± 1		
9	$\begin{array}{c} \text{OC}_2\text{H}_5 \\ \\ \text{CH}_3(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_2\text{Si}-\text{OCH}_2\text{H}_5 \\ \\ \text{OC}_2\text{H}_5 \end{array}$ <p>$\text{C}_{14}\text{H}_{32}\text{O}_3\text{Si}$ n-Octyltriethoxysilan (C8)</p>		59 ± 2	119 ± 31	85 87	38 37

	Silanisierungsagens	Titan (elektropoliert) ng/cm ²	Chromschwefelsäure- behandelt ng/cm ²	Ti-EP $\theta_V, {}^\circ$ $\theta_R, {}^\circ$	Ti-CSB $\theta_V, {}^\circ$ $\theta_R, {}^\circ$	Ti-EP $T_{1/2}$ (Tage)
10.	$\begin{array}{c} \text{OC}_2\text{H}_5 \\ \\ \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_2\text{Si}-\text{OCH}_2\text{H}_5 \\ \\ \text{OC}_2\text{H}_5 \\ \text{C}_{18}\text{H}_{40}\text{O}_3\text{Si} \\ \text{n-Dodecytriethoxysilan (C12)} \end{array}$	25 ± 1	76 ± 7	86 87	61 60	72 73
11	$\begin{array}{c} \text{OC}_2\text{H}_5 \\ \\ \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{16}-\text{CH}_2\text{Si}-\text{OCH}_2\text{H}_5 \\ \\ \text{OC}_2\text{H}_5 \\ \text{C}_{24}\text{H}_{52}\text{O}_3\text{Si} \\ \text{n-Octadecyltriethoxysilan (C18)} \end{array}$	14 ± 3	51 ± 11	87 87	87 86	57 32
12	$\begin{array}{c} \text{OC}_2\text{H}_5 \\ \\ \text{CF}_3-(\text{CF}_2)_5-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{Si}-\text{OCH}_2\text{H}_5 \\ \\ \text{OC}_2\text{H}_5 \\ \text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{F}_{13}\text{O}_3\text{Si} \\ (\text{Tridecafluor-1,1,2,2-tetrahydrooctyl}) \\ \text{Triethoxysilan (F-13)} \end{array}$	24 ± 4	62 ± 11	83 86	61 60	86 86

	Silanisierungsagens	Titan (elektropoliert) ng/cm ²	Titan Chromschwefelsäure- behandelt ng/cm ²	Ti-EP θ_V , °	Ti-CSB θ_R , °	Ti-EP θ_V , °	Ti-EP θ_R , °	$T_{1/2}$ (Tage)
13	$\begin{array}{c} \text{OC}_2\text{H}_5 \\ \\ \text{CF}_3(\text{CF}_2)_7\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Si}-\text{OCH}_2\text{H}_5 \\ \\ \text{OC}_2\text{H}_5 \end{array}$ <p>$\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{F}_{17}\text{O}_3\text{Si}$ (Heptadecafluor-1,1,2,2-tetrahydrodecyl) Triethoxysilan (F17)</p>	24 ± 7	57 ± 16	90 90	70 67	87 86	60 59	
14	$\begin{array}{c} \text{OC}_2\text{H}_5 \\ \\ \text{Si}-\text{OCH}_2\text{H}_5 \\ \\ \text{OC}_2\text{H}_5 \end{array}$ <p>$\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_3\text{Si}$ Phenyliethoxysilan (Phe)</p>	44 ± 12	67 ± 20	54 52	15 12	43 35	12 7	
15	$\begin{array}{c} \text{OC}_3 \\ \\ \text{F} \quad \text{F} \\ \text{F} \quad \text{F} \\ \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Si}-\text{OCH}_3 \\ \\ \text{OC}_3 \end{array}$ <p>$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{F}_5\text{Si}$ Pentafluorphenylpropyltrimethoxysilan (5FPP)</p>	50 ± 7	105 ± 13	77 80	17 18	57 45	6 5	

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung bioaktiver Implantatoberflächen von metallischen oder keramischen Materialien, bei dem in einem ersten Schritt Ankermoleküle mit hydrophoben Resten an der Oberfläche des Implantatmaterials kovalent gebunden werden und in einem zweiten Schritt Mediatormoleküle, die infolge nicht-kovalenter Wechselwirkungen zwischen den Mediatormolekülen und den hydrophoben Resten der Ankermoleküle immobilisiert werden, auf das so behandelte Implantatmaterial gegeben werden, wobei im ersten Schritt die Beladungsdichte der Ankermoleküle auf der Implantatoberfläche in Abhängigkeit von der Kettenlänge des hydrophoben Restes des Ankermoleküls so gewählt wird, daß die Ankermoleküle selbst miteinander nicht in Wechselwirkung treten und in Abhängigkeit von der überdeckten Fläche auf dem Implantatmaterial, die von einem einzelnen im zweiten Schritt absorbierten Mediatormolekül bedeckt wird, mindestens 10, bevorzugt 15 Kontaktstellen zwischen den hydrophoben Resten der Ankermoleküle zur hydrophoben Wechselwirkung mit dem einzelnen Mediatormolekül gebildet werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die hydrophoben Resten der Ankermoleküle Reste mit 1 bis 30, bevorzugt 3 bis 20, besonders bevorzugt 3 bis 8 Kohlenstoffatomen, die auch durch Silizium- oder Heteroatome wie N, O oder S in der Kette ersetzt sein können, sind, wobei die hydrophoben Reste auch gegebenenfalls mit einem oder mehreren Substituenten von Halogen, Alkoxy-, Hydroxyl-, Thiol-, Amino-, Alkylamino-, Dialkylamino oder Trialkylamino-Gruppen, wobei die Alkylgruppen des Substituenten bevorzugt 1 - 6 Kohlenstoffatome aufweisen und geradkettig oder verzweigt sein können, substituiert sein können.

3. Verfahren nach Anspruch 2, bei dem die hydrophoben Reste verzweigte gegebenenfalls wie oben substituierte Kohlenstoffketten mit 1 bis 30, bevorzugt 3 bis 20, besonders bevorzugt 3 bis 8 Kohlenstoffatomen sind.
5
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das Implantatmaterial aus einem Material, ausgewählt aus der Gruppe der Metalle, der metallischen Legierungen, der keramischen Materialien oder Kombinationen davon, besteht.
10
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem als Mediatormoleküle biologisch aktive Substanzen wie Knochenwachstumsfaktoren aus der Klasse der BMP-Proteine, Antibiotika oder Mischungen davon verwendet werden.
15
6. Verfahren nach Anspruch 5, bei dem als Knochenwachstumsfaktor BMP-2 oder BMP-7 verwendet wird.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Oberfläche des Implantatmaterials vor der kovalenten Bindung der Ankermoleküle mit einer hydrophilen Beschichtung versehen wird.
20
8. Verfahren nach Anspruch 7, bei dem die hydrophile Beschichtung eine hydrophilen Oxidschicht ist.
25
9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, bei dem die Oberfläche des Implantatmaterials, ausgewählt aus Titan, Titanlegierungen, Aluminium oder rostfreiem Stahl, vor der kovalenten Bindung der Ankermoleküle durch Behandlung mit Chromschwefelsäure über einen Zeitraum von 0,5 bis zu 3 Stunden bei 100 bis 250°C mit einer Oxidschicht versehen wird.
30
- 35 10. Verfahren nach Anspruch 9, bei dem die

Chromschwefelsäure eine Dichte von mehr 1,40 g/cm; hat.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem im ersten Schritt als Ankermoleküle Kohlenstoffreste, die geradkettig oder verzweigt sein können, mit 1 bis 30, bevorzugt 1 bis 20 Kohlenstoffatomen, besonders bevorzugt 1 bis 15 Kohlenstoffatomen, die auch gegebenenfalls mit einer oder mehreren Substituenten von Halogen, Alkoxy-, Hydroxyl-, Thiol-, Amino-, Alkyl- oder Dialkylamino-Gruppen substituiert sein können, an der Oberfläche des Implantatmaterials kovalent gebunden werden und im zweiten Schritt Knochenwachstumsfaktoren, die infolge nicht-kovalenter Wechselwirkungen zwischen den Knochenwachstumsfaktoren und den hydrophoben Resten der Ankermoleküle immobilisiert werden, auf das so behandelte Implantatmaterial gegeben werden, wobei im ersten Schritt die Beladungsdichte der Ankermoleküle auf der Implantatoberfläche in Abhängigkeit von der Kettenlänge des hydrophoben Restes des Ankermoleküls so gewählt wird, daß die Ankermoleküle selbst miteinander nicht in Wechselwirkung treten und in Abhängigkeit von der überdeckten Fläche auf dem Implantatmaterial, die von einem einzelnen im zweiten Schritt absorbierten Knochenwachstumsfaktormolekül bedeckt wird, mindestens 10, bevorzugt 15 Kontaktstellen zwischen den hydrophoben Resten der Ankermoleküle zur hydrophoben Wechselwirkung mit dem einzelnen Knochenwachstumsfaktormolekül gebildet werden.
12. Verfahren nach Anspruch 11, bei dem die Kohlenstoffreste im ersten Schritt je nach Verzweigungsgrad des verwendeten Restes in einer Anzahl von mindestens 3, bevorzugt mindestens 5 und besonders bevorzugt mindestens 10 Resten auf 10 nm² der Implantatoberfläche immobilisiert werden.

13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, bei dem die Kohlenstoffreste im ersten Schritt je nach Verzweigungsgrad des verwendeten Restes in einer Anzahl von maximal 100, bevorzugt maximal 60 Resten auf 10 nm² der Implantatoberfläche immobilisiert werden.
5
14. Implantat, erhältlich nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1-13.
10
15. Implantat nach Anspruch 14, bei dem das Implantatmaterial Titan, Titanlegierungen, Aluminium rostfreiem Stahl, Stahlegierungen oder Hydroxylapatit besteht.
15
16. Implantat nach Anspruch 14 oder 15, bei dem das Implantat eine Gelenk- oder Knochenprothese, ein Stent oder ein Zahnimplantat ist.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/DE 01/02893

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61L27/22 A61L27/54

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 92 00047 A (UNIV CASE WESTERN RESERVE) 9 January 1992 (1992-01-09) figure page 3, line 1-3 page 4, line 31 -page 5, line 15 page 6, line 19-29 page 22, line 18-31 page 27, line 4 -page 28, line 1 claims 9,13,21	1-5,7,8, 14-16 9,10
Y	WO 99 26674 A (JENNISSEN HERBERT P) 3 June 1999 (1999-06-03) page 7, line 6-25 page 8, line 35 -page 9, line 14 claims	9,10

	-/-	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the International filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 January 2002

Date of mailing of the international search report

23/01/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patenlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Böhm, I

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 01/02893

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4 652 459 A (ENGELHARDT ACHIM) 24 March 1987 (1987-03-24) abstract ---	1
A	US 4 828 563 A (MUELLER-LIERHEIM WOLFGANG G K) 9 May 1989 (1989-05-09) abstract ---	1
A	WO 00 25841 A (SAWITOWSKI THOMAS ;FISCHER ALFONS (DE); SCHMID GUENTER (DE); BRAND) 11 May 2000 (2000-05-11) the whole document -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int'l Application No

PCT/JP 01/02893

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9200047	A 09-01-1992	AU 8286491 A WO 9200047 A1		23-01-1992 09-01-1992
WO 9926674	A 03-06-1999	AU 2408099 A WO 9926674 A2 DE 19881727 D2 EP 1035879 A2		15-06-1999 03-06-1999 04-01-2001 20-09-2000
US 4652459	A 24-03-1987	DE 3241589 A1 AT 35508 T AU 567310 B2 AU 2111183 A BE 898186 A CA 1229953 A1 DE 3377264 D1 DK 512183 A EP 0109061 A1 JP 59103660 A NO 834064 A ,B,		17-05-1984 15-07-1988 19-11-1987 17-05-1984 01-03-1984 08-12-1987 11-08-1988 11-05-1984 23-05-1984 15-06-1984 11-05-1984
US 4828563	A 09-05-1989	DE 3521684 A1 AT 71405 T AT 86129 T DE 3683321 D1 DE 3687861 D1 EP 0205790 A2 EP 0205997 A2 FI 862503 A IL 79054 A JP 62051984 A JP 62049856 A US 4789634 A		18-12-1986 15-01-1992 15-03-1993 20-02-1992 08-04-1993 30-12-1986 30-12-1986 19-12-1986 31-08-1990 06-03-1987 04-03-1987 06-12-1988
WO 0025841	A 11-05-2000	DE 19855421 A1 DE 19910188 A1 AU 1378200 A BR 9914954 A CN 1325315 T CZ 20011455 A3 WO 0025841 A1 EP 1124594 A1 NO 20012115 A AU 3156100 A DE 19948783 A1 WO 0048660 A1 EP 1150738 A1 NO 20013917 A		11-05-2000 11-05-2000 22-05-2000 06-11-2001 05-12-2001 12-09-2001 11-05-2000 22-08-2001 01-06-2001 04-09-2000 24-08-2000 24-08-2000 07-11-2001 10-08-2001

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

	Internationales Aktenzeichen PCT/DE 01/02893
--	--------------------------------------------------------

A. KLASSEFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 A61L27/22 A61L27/54

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprässtoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 A61L

Recherchierte aber nicht zum Mindestprässtoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 92 00047 A (UNIV CASE WESTERN RESERVE) 9. Januar 1992 (1992-01-09)	1-5, 7, 8, 14-16
Y	Abbildung Seite 3, Zeile 1-3 Seite 4, Zeile 31 -Seite 5, Zeile 15 Seite 6, Zeile 19-29 Seite 22, Zeile 18-31 Seite 27, Zeile 4 -Seite 28, Zeile 1 Ansprüche 9, 13, 21 ---	9, 10
Y	WO 99 26674 A (JENNISSEN HERBERT P) 3. Juni 1999 (1999-06-03) Seite 7, Zeile 6-25 Seite 8, Zeile 35 -Seite 9, Zeile 14 Ansprüche ---	9, 10 -/-

<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmelde datum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchebericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmelde datum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmelde datum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Rechercheberichts

15. Januar 2002

23/01/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchebehörde

Bevollmächtigter Bediensteter

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016

Böhm, I

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int - nationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/02893

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 4 652 459 A (ENGELHARDT ACHIM) 24. März 1987 (1987-03-24) Zusammenfassung ---	1
A	US 4 828 563 A (MUELLER-LIERHEIM WOLFGANG G K) 9. Mai 1989 (1989-05-09) Zusammenfassung ---	1
A	WO 00 25841 A (SAWITOWSKI THOMAS ;FISCHER ALFONS (DE); SCHMID GUENTER (DE); BRAND) 11. Mai 2000 (2000-05-11) das ganze Dokument -----	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/02893

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9200047	A	09-01-1992	AU WO	8286491 A 9200047 A1		23-01-1992 09-01-1992
WO 9926674	A	03-06-1999	AU WO DE EP	2408099 A 9926674 A2 19881727 D2 1035879 A2		15-06-1999 03-06-1999 04-01-2001 20-09-2000
US 4652459	A	24-03-1987	DE AT AU AU BE CA DE DK EP JP NO	3241589 A1 35508 T 567310 B2 2111183 A 898186 A 1229953 A1 3377264 D1 512183 A 0109061 A1 59103660 A 834064 A ,B,		17-05-1984 15-07-1988 19-11-1987 17-05-1984 01-03-1984 08-12-1987 11-08-1988 11-05-1984 23-05-1984 15-06-1984 11-05-1984
US 4828563	A	09-05-1989	DE AT AT DE DE EP EP FI IL JP JP US	3521684 A1 71405 T 86129 T 3683321 D1 3687861 D1 0205790 A2 0205997 A2 862503 A 79054 A 62051984 A 62049856 A 4789634 A		18-12-1986 15-01-1992 15-03-1993 20-02-1992 08-04-1993 30-12-1986 30-12-1986 19-12-1986 31-08-1990 06-03-1987 04-03-1987 06-12-1988
WO 0025841	A	11-05-2000	DE DE AU BR CN CZ WO EP NO AU DE WO EP NO	19855421 A1 19910188 A1 1378200 A 9914954 A 1325315 T 20011455 A3 0025841 A1 1124594 A1 20012115 A 3156100 A 19948783 A1 0048660 A1 1150738 A1 20013917 A		11-05-2000 11-05-2000 22-05-2000 06-11-2001 05-12-2001 12-09-2001 11-05-2000 22-08-2001 01-06-2001 04-09-2000 24-08-2000 24-08-2000 07-11-2001 10-08-2001